

DAS HEMMVERHALTEN DES
INTER- α -TRYPSININHIBITORS
UND SEINER SPALTPRODUKTE
GEGENÜBER TRYPSIN,
 α -CHYMOTRYPSIN SOWIE
PANKREAS-ELASTASE UND
PMN-ELASTASE

Franz Angerer

*Lissa
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in
der Chirurgischen Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Fritz

DAS HEMMVERHALTEN DES INTER- α -TRYPSININHIBITORS UND SEINER SPALT-
PRODUKTE GEGENÜBER TRYPSIN, α -CHYMOTRYPSIN SOWIE PANKREAS-ELASTASE
UND PMN-ELASTASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Angerer

aus

Berchtesgaden

Jahr

1983

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.85

Herrn Prof. H. Fritz möchte ich sehr herzlich danken sowohl für die Überlassung des Themas dieser Arbeit als auch für die Möglichkeit, die Untersuchungen an seinem Institut durchführen zu können.

Frau Dr. M. Jochum gilt mein Dank für ihre zuvorkommende Hilfsbereitschaft und ihre tatkräftige Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Frau U. Hof und Frä. K. Seidl für ihre technischen Ratschläge danken.

ABKÜRZUNGEN:

BIS	= N,N-Methylenbisacrylamid
ITI	= Inter- α -Trypsininhibitor
IU	= Inhibitoreinheit
N ^{α} -Bz-Arg-NHNp (L-BAPA)	= N ^{α} -Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid
NaAc	= Natriumacetat
NCS	= N-Chlor-succinimid
PAGE	= Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PER	= Ammoniumpersulfat
SANA	= N ^{α} -[3-Carboxypropionyl]-L-alanyl-L-alanyl- L-alanyl-p-nitroanilid
SDS	= Natriumdodecylsulfat
TMED	= N,N,N,N-Tetramethyl-äthylendiamin
TRA	= Triäthanolamin
Tricine	= N-tris[hydroxymethyl]methyl glycin
TRIS	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
S-2537	= H-D-Arg-Val-Phe-pNA·2HCl

INHALTSVERZEICHNIS

A EINFÜHRUNG

B MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte
2. Substanzen
3. Methoden
 - 3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - 3.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese
 - 3.3. Enzym- und Hemmteste
 - 3.3.1. PMN-Elastase-Test
 - 3.3.2. Pankreas-Elastase-Test
 - 3.3.3. Trypsin-Test
 - 3.3.4. α -Chymotrypsin-Test
 - 3.4. Oxidation des ITI
 - 3.4.1. mit Chloramin-T
 - 3.4.2. mit NCS

C ERGEBNISSE

1. Charakterisierung des ITI-Präparates
 - 1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - 1.2. Immunelektrophorese

- 2. Untersuchtes Hemmspektrum des ITI
 - 2.1. Hemmung der PMN-Elastase durch
 - 2.1.1. nativen ITI
 - 2.1.2. oxidierten ITI
 - 2.2. Hemmung der Pankreas-Elastase
 - 2.3. Hemmung des Trypsins
 - 2.4. Hemmung des α -Chymotrypsins
- 3. Charakterisierung der PMN-Elastase — ITI-Reaktion
 - 3.1. Kinetische Messungen
 - 3.1.1. K_i -Wert
 - 3.1.2. Hemmart
 - 3.1.3. Einstellung des Hemmgleichgewichts
 - 3.2. Elektrophoretische Methoden
 - 3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - 3.2.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

D DISKUSSION

E ZUSAMMENFASSUNG

F LITERATURVERZEICHNIS

A. EINFÜHRUNG

Zahlreiche Proteinase-Inhibitoren (Abb. 1), die im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten vorkommen, dienen zur Regulation proteolytischer Prozesse im Organismus.

Mengenmäßig und aufgrund des Hemmpotentials haben dabei α_2 -Makroglobulin und α_1 -Proteinase-Inhibitor die größte Bedeutung. Dagegen ist die physiologische Funktion des nativen ITI im Plasma angesichts des derzeitigen bekannten Hemmspektrums weitgehend unklar: Trypsin und Chymotrypsin werden durch den ITI weit weniger stark gehemmt als durch α_2 -M, α_1 -PI und α_1 -AC.

Der Name ITI leitet sich einerseits von der elektrophoretischen Mobilität des Proteins in der Papier- und Zellulose-Acetatfolien-elektrophorese (zwischen den α_1 - und α_2 -Globulinen) und seiner Hemmwirkung gegenüber Trypsin andererseits ab.

Nach Hochstrasser und Mitarbeiter stellt der native ITI, der einen Kohlenhydratanteil von ca. 9 % besitzt (29), eine intravasale Depotform eines "physiologischen" Inhibitors dar, dessen Molekularmasse mit 30 bzw. 34 kDa angegeben wird (15, 31).

Durch limitierte Proteolyse entsteht dieser niedermolekulare Inhibitor aus dem nativen ITI; von mehreren untersuchten Enzymen - Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Granulozytenelastase (PMN-Elastase) - erwies sich die PMN-Elastase in vitro als die potenteste Proteinase für die Fragmentierung (4). Dabei entstehen neben dem physiologischen Inhibitor mindestens noch zwei säurelabile Abbauprodukte, die immunologische Kreuzreaktion mit dem nativen ITI

Abk.	Inhibitor	M_r $\times 10^{-3}$	Durchschnittskonzent. mg/100 ml	mol/l	Zielenzyme
α_2^M	α_2 -Makroglobulin	725	260	3,6	Neutrale u. saure Proteinasen, Thiolproteinasen
α_1^{PI}	α_1 -Proteinaseinhibitor	50	260	52	Neutrale Proteinasen aus Leukozyten, Pankreas und anderen Geweben
α_1^{AC}	α_1 -Antichymotrypsin	70	45	6,4	Chymotrypsin, Kathepsin G
β_1^{CI}	β_1 -Kollagenaseinhibitor	40	1,5	0,4	Kollagenasen (Metalloenzyme)
ITI	Inter- α -Trypsininhibitor	180	45	2,8	Trypsin, Chymotrypsin, Akrosin, Plasmin
AT ITI	Antithrombin III	65	26	4,0	Gerinnungsenzyme
α_2^{PI}	α_2 -Plasmininhibitor	70	6	0,9	Fibrinolyseenzyme
C1 INA	C1-Inaktivator	100	24	2,4	Komplementenzyme, Kallikrein

Abb. 1: Übersicht der menschlichen Proteinaseinhibitoren

zeigen (15).

Der physiologische Inhibitor I-30, ehemals I-34 (18), ist im Gegensatz zum nativen ITI säurestabil und kommt in menschlichem Serum, Urin sowie Bronchial- und Nasensekret vor. Er enthält 50 % Kohlenhydrate. Die Kohlenhydratseitenketten befinden sich an zwei Positionen des Moleküls. Die erste Seitenkette ist O-glycosidisch über den Serinrest in Position 10 des N-terminalen Extensionspeptides gebunden. Die zweite Seitenkette bildet eine N-glycosidische Bindung mit dem Asparaginrest in Position 24 der antitryptisch inaktiven Kunitz-Typ-Domäne. Sowohl die Zusammensetzung der Oligosaccharidseitenketten als auch die Aminosäuresequenz des Inhibitors sind bekannt (17, 19, 30, 31, 32).

Die Hemmzentren sowohl des nativen Inhibitors als auch des I-30 sind durch zwei Kunitz-Typ-Domänen charakterisiert:

Die antitryptisch aktive Domäne wird durch eine Polypeptidkette gebildet, deren Sequenz zu den bekannten Kunitz-Typ-Inhibitoren (z.B. Aprotinin) homolog ist. Im reaktiven Zentrum befindet sich ein Argininrest (19, 27, 30).

In der antitryptisch inaktiven Domäne weist das reaktive Zentrum einen Methioninrest auf. Dies deutet darauf hin, daß durch diese Domäne neben Chymotrypsin und chymotrypsinähnlichen Proteasen auch PMN-Elastase gehemmt werden könnte (30). Bisher konnte lediglich gezeigt werden, daß der aus dem Serum isolierte native ITI sowie sein Spaltprodukt I-30 Trypsin, Chymotrypsin, Akrosin und

Plasmin hemmen (6, 8, 10).

Kürzlich wurden aus Urin zwei Hemmstoffe isoliert, die Trypsin, Chymotrypsin und granulozytäre Elastase inhibieren, hingegen nicht die Pankreas-Elastase. Die Molekularmassen werden mit 44 kDa bzw. 20 kDa in der Dodecyl-Sulfat-Gelelektrophorese angegeben. Beide Inhibitoren zeigen sowohl untereinander als auch mit dem ITI aus Plasma immunologische Kreuzreaktivität (21). Nach Angaben der Autoren soll der leichtere von diesen Inhibitoren identisch sein mit dem von der Arbeitsgruppe Hochstrasser im Urin gefundenen Inhibitor (32). Die bei letzterem fehlende Elastasehemmung hat ihre Ursache möglicherweise in den verwendeten Isolierungsmethoden (13), insbesondere der Behandlung mit Perchlorsäure und dem Zusatz von Trypsin. Hierdurch wird der Urin-Inhibitor unter Umständen so verändert, daß er nicht mehr granulozytäre Elastase, sondern nur noch Rindertrypsin, Chymotrypsin und Plasmin hemmt (10, 21).

Im Sekret der Nasal- und Bronchialschleimhaut sind neben dem humoralen α_1 -Proteinaseinhibitor auch niedermolekulare, säurestabile Proteaseinhibitoren enthalten. Unter diesen wurde ebenfalls der säurestabile ITI identifiziert. Er hemmte Trypsin und Chymotrypsin, nicht jedoch Schweinepankreas-Elastase und nur schwach die PMN-Elastase (9, 24).

Die physiologischen Funktionen des nativen ITI wie auch seiner Abbauprodukte sind noch weitgehend unbekannt. Bei einigen pathophy-

siologischen Zuständen hingegen, wurden signifikante Veränderungen der natürlichen Umsatzrate nachgewiesen:

Bei Patienten mit Nephropathien unterschiedlicher Genese stieg die Konzentration des I-30 im Serum proportional zum Serumkreatinin an und erreichte Werte vom 30-fachen der Norm [Normbereich: 5 bis 10 mIU/ml (11, 12)]. Weiterhin ist bei kompensierter Niereninsuffizienz ein diskreter, bei Urämie ein deutlicher ITI-Anstieg zu finden. Aus diesen Befunden wurde gefolgert, daß die Niere das Hauptumsatzorgan für das System ITI/I-30 darstellt; bei Nephropathien ist der Umsatz eingeschränkt, es resultiert ein Anstieg der ITI-Konzentration. Eine Konzentrationserhöhung des I-30 ist das Ergebnis der eingeschränkten glomerulären Filtration des außerhalb der Niere aus ITI freigesetzten I-30 (11, 12).

Bei entzündlichen Prozessen - besonders stark ausgeprägt bei Sepsis - aber auch in der Schwangerschaft und bei malignen Tumoren kommt es über die physiologische Freisetzungsrates hinaus zu einer verstärkten Abspaltung des I-30 vom nativen ITI, d.h. die Konzentration des nativen ITI wird signifikant erniedrigt, die des I-30 erhöht (14, 15, 17, 31, 33).

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, die Hemmwirkung des nativen ITI oder seines Abbauproduktes auf die PMN-Elastase in vitro nachzuweisen, um damit der Aufklärung seiner physiologischen Funktion, eventuell bei Krankheiten mit massiver Freisetzung von lysosomalen Enzymen (z.B. Elastase aus Granulozyten bei Sepsis), näherzukommen.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1. Geräte

Immunelektrophoresekammer, LKB 2117 Multiphor

Photometer, Eppendorf, Typ 1101 M

B.2. Substanzen

Acrylamid, Serva, Art.-Nr. 10 675

Agarose-Immunelektrophorese-Tabletten, Bio-Rad, Art.-Nr. 170-3003

Antiserum gegen Inter- α -Trypsininhibitor ¹⁾

BIS, Serva, Art.-Nr. 29 195

Calciumlactat, Merck, Art.-Nr. 2103

Chloramin-T, Merck, Art.-Nr. 2426

α -Chymotrypsin, Novo, Batch 27

Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, Art.-Nr. 35 051

Humane, granulozytäre Elastase ²⁾

Immunglobulinfraktion gegen humane, granulozytäre Elastase,
Merck, Charge S 108/4

Inter- α -Trypsininhibitor ¹⁾

Immunelektrophoreseplatten, LKB, Plastic Plates Nr. 2117-406

N ^{α} -BZ-Arg-NHNp (L-BAPA), Merck, Art.-Nr. 10 754

1) Die ITI-Präparation, sowie Antiserum gegen ITI wurden freundlicherweise von Dr. Karges, Behringwerke AG, Marburg zur Verfügung gestellt.

2) Humane, granulozytäre Elastase war ein Geschenk von Dr. Neumann, Merck, Darmstadt.

Natriumacetat, Merck, Art.-Nr. 6267
Natriumazid, Merck, Art.-Nr. 6688
NCS, EGA-Chemie, Art.-Nr. 10 968-1
Pankreas-Elastase, Merck, Art.-Nr. 24 552
PER, Serva, Art.-Nr. 13 375
SANA, Paesel (Frankfurt), Art.-Nr. 3071
S-2537, Kabi (Schweden), Art.-Nr. 790-43 II
TRA, Merck, Art.-Nr. 8379
TRIS, Merck, Art.-Nr. 8382
Tricine, Sigma, Art.-Nr. T-0377
TMED, Serva, Art.-Nr. 35 925
Triton-X-100, Serva, Art.-Nr. 37 240
Trypsin vom Rind, Merck, Art.-Nr. 24 581
(Abkürzungen s. Seite 1)

B.3. Methoden

B.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden nach einer Vorschrift von Fehmström H. und Moberg U. durchgeführt.
(LKB Note 306, April 1977).

Folgende Lösungen wurden hergestellt:

1. Phosphat-Stammpuffer: 39,0 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
128,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
10,0 g SDS
mit dest. H_2O auf 5 l aufgefüllt,
0,2 M ; pH 7,1
2. Elektrodenpuffer: Phosphat-Stammpuffer, 1:1 verdünnt
mit dest. H_2O
3. Acrylamidlösung: 22,2 g Acrylamid
0,6 g BIS
mit dest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt
4. Ammoniumpersulfatlösung: 150 mg PER
mit dest. H_2O auf 10 ml aufgefüllt
5. Phosphat-Probenpuffer: 10,0 ml Phosphat-Stammpuffer
2,0 g SDS
mit dest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt,
0,02 M ; pH 7,0

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele:

1. 5 % SDS-Polyacrylamidgele: 14,9 ml dest. H_2O
33,0 ml Phosphat-Stammpuffer
14,8 ml Acrylamidlösung
3,2 ml PER
0,1 ml TMED

2. 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel: 7,5 ml dest. H₂O
 33,0 ml Phosphat-Stammpuffer
 22,2 ml Acrylamidlösung
 3,2 ml PER
 0,1 ml TMED

Zusammensetzung der verwendeten Standards:

Standard 1: Ovalbumin	: M_r = 45.000 Da
Rinderserumalbumin:	M_r = 68.000 Da
Phosphorylase b	: M_r = 94.000 Da
β -Galaktosidase	: M_r = 130.000 Da
Myosin	: M_r = 200.000 Da
Standard 2: Ovalbumin	: M_r = 45.000 Da
Rinderserumalbumin:	M_r = 68.000 Da
Phosphorylase b	: M_r = 94.000 Da
Carboanhydrase	: M_r = 30.000 Da
Sojabohnen-Trypsin-	
inhibitor (Kunitz):	M_r = 21.000 Da
Lysozym	: M_r = 14.300 Da

Zum Auftragen auf die SDS-Polyacrylamidgele wurden die Proben jeweils 1:1 mit Phosphat-Probenpuffer verdünnt, für zwei Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden als Horizontal-Flachgelelektrophoresen durchgeführt. Die Dicke der Gelplatten betrug

2 mm, das aufgetragene Probenvolumen 10 μ l. Es wurde eine Vor-elektrophorese von ca. 20 Minuten bei einer Feldstärke von 3 bis 4 V/cm durchgeführt; die Elektrophorese dauerte nach dem Auftragen der Proben 3 Stunden bei einer Feldstärke von ca. 8 V/cm. Sofort nach der Elektrophorese wurden die Gele für ca. 30 Minuten in 20 %iger Trichloressigsäure fixiert. Zur Färbung (ca. 2 Stunden) diente Coomassie Brilliant Blue R-250 (1,5 g Coomassie gelöst in 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 400 ml dest. H₂O). Für die Entfärbung (ca. 1 Tag) wurde eine Lösung aus 200 ml Methanol, 100 ml Essigsäure und 700 ml dest. H₂O verwendet.

B.3.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die Immunelektrophoresen wurden nach Vorschriften von Becker W. und Sieber A. [Methoden der qualitativen und quantitativen Immunelektrophorese, Behring Werke], Laurell C-B. [Scand. I. Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 124, 39 (1972)] und Ganrot P.O. [Scand. I. Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 124, 39 (1972)] durchgeführt.

Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese wurden Plastikfolien (8,4 x 9,4 cm) und 1 %ige Agarose verwandt. Die Elektrophorese in der 1. Dimension dauerte 2 Stunden bei einer Feldstärke von ca. 9 V/cm, in der 2. Dimension 15 Stunden bei einer Feldstärke von ca. 3 V/cm. Die Konzentration der Antiseren in der 2. Dimension wird in den entsprechenden Versuchen angegeben. Aufgetragen

wurden jeweils 5 μ l Probenvolumen in der 1. Dimension. Als Elektrophorese-Puffer diente wieder TRIS-Tricine-Puffer.

B.3.3. Enzym- und Hemmteste

Als Anleitung diente folgende Literatur: Schiessler et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 (1977); Fritz H. et al., Methoden der enzymatischen Analyse (1974); Deutsche Kabi, Laboranweisung (1978).

B.3.3.1. PMN-Elastase-Test, Hemmung durch ITI:

Substrat : 1,35 mg SANA/1ml TRA-Puffer
Puffer : 0,2 M TRA, 2 M NaCl; pH 7,8
ITI : 1 μ g/1 μ l TRA-Puffer
Elastase : 1 μ g/1 μ l NaAc-Puffer; 0,1 M Na-acetat,
0,05 % Triton-X-100; pH 6,5
Ansatz : Puffer : 1970 μ l - x μ l
Elastase: 30 μ l
ITI : x μ l

15 min Inkubation bei 25⁰C

Substrat: 1 ml SANA

Meßvolumen: 3 ml; λ = 405 nm; T = 25⁰C

B.3.3.2. Pankreas-Elastase-Test, Hemmung durch ITI:

Substrat : 1,35 mg SANA/1 ml TRA-Puffer

Puffer : 0,2 M TRA, 2 M NaCl; pH 7,8

ITI : 1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ TRA-Puffer

Elastase : 2,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 0,0025 N HCl

Ansatz : Puffer : 1960 μl - x μl

Elastase: 40 μl

ITI : x μl

10 min Inkubation bei 25°C

Substrat: 1 ml SANA

Meßvolumen: 3 ml; λ = 405 nm; T = 25°C

B.3.3.3. Trypsin-Test, Hemmung durch ITI:

Substrat : 50 mg L-BAPA/100 ml dest. H₂O

Puffer : 0,2 M TRA, 2 M NaCl; pH 7,8

ITI : 1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ TRA-Puffer

Trypsin : 20 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ 0,0025 N HCl

Ansatz : Puffer : 1950 μl - x μl

Trypsin : 50 μl

ITI : x μl

10 min Inkubation bei 25°C.

Substrat: 1 ml L-BAPA

Meßvolumen: 3 ml; λ = 405 nm; T = 25°C

B.3.3.4. α -Chymotrypsin-Test, Hemmung durch ITI:

Substrat : 1,228 mg S-2537/1 ml dest. H_2O
Puffer : 0,05 M TRIS, 0,4 M NaCl, 0,003 M CaCl_2 ,
0,005 % Triton-X-100; pH 7,8
ITI : 1 μg /10 μl TRIS-Puffer
 α -Chymotrypsin: 1 μg /100 μl 0,0025 N HCl
Ansatz : Puffer: : 800 μl - x μl
 α -Chymotrypsin: 100 μl
ITI : x μl
10 min Inkubation bei 25°C.
Substrat : 100 μl
Meßvolumen : 1 ml; λ = 405 nm; T = 25°C

B.3.4. Oxidation des ITI (20, 28)

B.3.4.1. Oxidation mit Chloramin-T-Lösung

Chloramin-T-Lösung: 10 μmol /1 ml dest. H_2O
Puffer : 0,1 M TRIS; pH 8,5
ITI : 237 μg /100 μl TRIS-Puffer
100 μl ITI-Lösung wurden mit 15 μl Chloramin-T-Lösung
(ca. 100facher molarer Überschuß) versetzt und 20 min
bei 25°C inkubiert.
Anschließend erfolgte eine 4stündige Dialyse gegen
TRIS-Puffer bei 8maligem Pufferwechsel.

B.3.4.2. Oxidation mit NCS

NCS : 10 μmol /1 ml dest. H_2O

Puffer: 0,1 M TRIS; pH 8,5

ITI : 237 μg /100 μl TRIS-Puffer

Zu 100 μl ITI-Lösung wurden 15 μl NCS-Lösung (ca. 100facher molarer Überschuß) hinzugegeben und 20 min bei 25°C inkubiert.

Dann wurde eine 4 stündige Dialyse gegen TRIS-Puffer bei 8maligem Pufferwechsel durchgeführt.

C. ERGEBNISSE

C.1. Charakterisierung des ITI-Präparates

Die verwendete ITI-Präparation aus menschlichem Serum stellte ein zu 80 % reines Forschungsprodukt der Behringwerke, Marburg dar. Die Isolierung erfolgte u.a. mittels DE-32 Cellulose, Sulfatfällung und Gelfiltration an Sephadex G-150 nach Heimbürger und Mitarbeiter (7, 8). Als Hauptverunreinigungen wurden Präalbumin, Coeruloplasmin und Complementfaktor C4 identifiziert. Das Lyophilisat mit ca. 360 mg Trockengewicht enthielt 142 mg ITI neben Citrat, Natriumchlorid und Mannit als Puffersalze und Stabilisatoren.

Da eine Fragmentierung des nativen, hochmolekularen ITI in kleinere Inhibitormoleküle nicht nur physiologischerweise im Blut auftritt (10, 25, 29), sondern auch Isolierung und Lagerung selbst schon zu Spaltprodukten führen (22, 25), die ihrerseits mit Antikörper gegen das native Molekül reagieren, wurde zunächst das vorliegende ITI-Präparat mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der zweidimensionalen Immunelektrophorese näher charakterisiert.

C.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Ermittlung der relativen Molekularmassen des nativen ITI bzw. eventueller Spaltprodukte wurden neben der ITI-Lösung (Konzentration: $360 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ TRA-Puffer) zwei Standardproteinserien für den

+

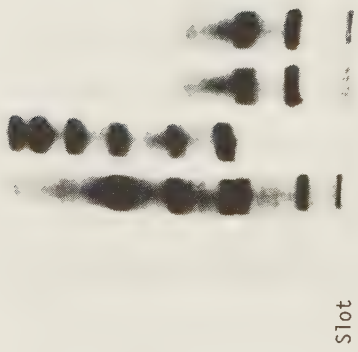


Abb. 2: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, 7,5 % Gel.

Aufgetragen wurde von links nach rechts:

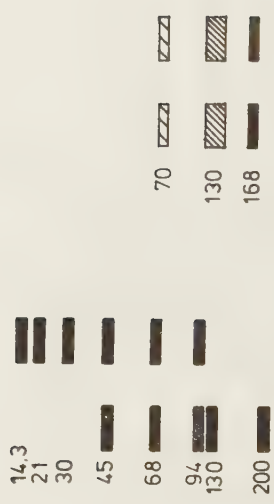
Slot 2 u. 3: Standard 1 bzw. 2

(Zusammensetzung s. B.3.1.)

Slot 4 u. 5: jeweils ITI-Lösung mit einer

Konzentration von

360 µg ITI/100 µl TRA-Puffer



Standards ITI

Abb. 3: Schematische Darstellung der Protein-

banden aus der SDS-PAGE (s. Abb. 2).

Die nebenstehenden Zahlen entsprechen

den relativen Molekularmassen angegeben

in kDa.

Farbintensität der Banden:



hoch- bzw. niedermolekularen Bereich mittels eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgels getrennt.

Wie Abb. 2 zeigt, setzte sich der in TRA-Puffer gelöste ITI aus mindestens drei Hauptfraktionen mit Molekularmassen von 168 kDa, 130 kDa und 70 kDa zusammen. Dabei dürfte die 168 kDa-Bande dem nativen, hochmolekularen Inhibitor entsprechen, für den in der Literatur eine Molekularmasse zwischen 160 kDa (8) und 180 kDa - 200 kDa (25, 29) angegeben wird. Spaltprodukte mit der Molekülmasse von ca. 125 kDa und 68 kDa sind von Salier und Mitarbeitern (25) bzw. Bromke und Kueppers (3) beschrieben worden.

Da der hochmolekulare Bereich offensichtlich den größten Anteil in der untersuchten ITI-Präparation darstellt, wurde für die Berechnung der Inhibitorkonstante (C.3.1.1.) eine Molekularmasse von 170 kDa zugrunde gelegt.

C.1.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Nach immunelektrophoretischer Auftrennung zeigt das ITI-Präparat ein Hauptpräzipitat mit zwei "Gipfeln", eingerahmt von einem weiter anodenwärts gelegenen, hohen und einem mehr kathodenwärts befindlichen, niedrigen Präzipitationspeak (Abb. 4). Während die ineinander übergehenden Strukturen des Haupt-Präzipitates auf immunologische Kreuzreaktivität schließen lassen und zweifellos dem ITI zugeordnet werden können, ist die Identität der Neben-Präzipitate noch weitgehend unklar. Dieses Muster ist jedoch ähnlich dem mit Humanserum erhaltenen (Abb. 5) und entspricht den

+



○

+

Abb. 4: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Die Konzentration der verwendeten ITI-Lösung betrug $83,3 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ TRA-Puffer. In der 2. Dimension waren 1,4 % Anti-ITI-Serum enthalten.

-

+



○

+

-

Abb. 5: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Humanserum. Die Konzentration des Anti-ITI-Serum in der 2. Dimension betrug 0,5 %.

Darstellungen von Hochstrasser und Mitarbeitern (16), die für ihre Untersuchungen ebenfalls Antiserum der Firma Behringwerke, Marburg verwendeten. Inwieweit die schwächeren Präzipitationspeaks einerseits durch nicht kreuzreagierende, kleinemolekulare ITI-Spaltprodukte oder andererseits durch Verunreinigungen des benützten Antikörpers verursacht wurden, konnte weder von diesen Autoren, noch durch die vorliegende Arbeit zweifelsfrei geklärt werden.

C.2. Untersuchtes Hemmspektrum des ITI

In der Literatur (6, 8, 26) wird angegeben, daß der native ITI Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Akrosin hemmt, nicht jedoch die PMN-Elastase.

Wenn man annimmt, daß das Methionin im reaktiven Zentrum der anti-tryptisch inaktiven Domäne des ITI für die Hemmung der PMN-Elastase verantwortlich ist, so müßte bei Oxidation des Methioninrestes diese Hemmung weitgehend verschwinden. Bei den bisher verwendeten Isolierungsmethoden könnte nun das jeweilige ITI-Präparat neben anderen Veränderungen auch eine Oxidation erfahren haben, so daß die Granulozytenelastase nicht mehr gehemmt werden würde. Daher wurde das Hemmverhalten der verwendeten ITI-Präparation zuerst im "nativen" Zustand und anschließend im oxidierten Zustand geprüft.

C.2.1. Hemmung der PMN-Elastase durch

C.2.1.1. nativen ITI

Verschiedene Mengen an ITI wurden entsprechend dem nachfolgenden Schema in den in B.3.3.1. beschriebenen Elastasetest eingesetzt und nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min. die jeweiligen Restaktivitäten der Elastase gemessen:

Ansatz	1	2	3	4	5	6
ITI μg	—	75	150	300	500	750
Aktivität der Elastase %	100	69,9	46,8	23,2	12,2	8,1

Die tabellarisch und figurativ (Abb. 6) dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß entgegen den Literaturangaben (6, 8, 26) die Aktivität der PMN-Elastase durch die vorliegende ITI-Präparation herabgesetzt wird.

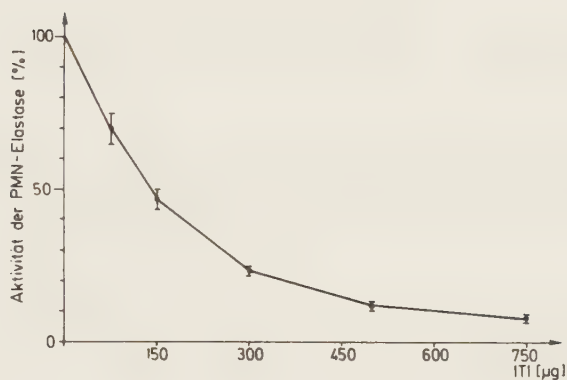


Abb. 6: Aktivität der PMN-Elastase bei Zugabe von steigenden Mengen an ITI.

C.2.1.2. oxidierten ITI

Die Oxidation erfolgte nach B.3.4. Um den Einfluß des verwendeten Oxidationsmittels (NCS bzw. Chloramin-T) auf den anschließenden Elastasetest auszuschalten, wurden die nachfolgend beschriebenen Proben zunächst dialysiert:

Ansatz		1	2	3	4
NCS bzw. Chloramin-T	μl	15	—	15	—
ITI	μl	100	100	—	—
TRIS-Puffer	μl	—	15	100	115

Es konnte festgestellt werden, daß das nach der Dialyse noch verbliebene NCS bzw. Chloramin-T unter den angegebenen Versuchsbedingungen keinen meßbaren Effekt auf die Bestimmung der PMN-Elastase zeigte.

Bei einem jeweils ca. 100fachen molaren Überschuß an Oxidationsmittel wurde die Hemmaktivität des ITI durch NCS von 67,4 % auf 57 %, durch Chloramin-T von 68 % auf 55,5 % vermindert.

C.2.2. Hemmung der Pankreas-Elastase

Eingesetzt wurden 1 μg Pankreas-Elastase und 150 μg ITI bzw.

300 μg ITI. Testablauf siehe B.3.3.2.

Die Restaktivität der Elastase nach Inkubation mit unterschiedlichen Inhibitormengen wurde in % der ungehemmten Probe angegeben:

Ansatz	1	2	3
ITI μg	—	150	300
Aktivität der Elastase %	100	133	120

Die in der obigen Tabelle wiedergegebenen Ergebnisse veranschaulichen, daß die Pankreas-Elastase durch die verwendeten Mengen an Inter- α -Trypsininhibitor (ca. 22- bzw. ca. 44facher molarer Überschuß) nicht nur nicht gehemmt, sondern eher geringfügig aktiviert wird.

Dies stimmt prinzipiell mit den Ergebnissen von B.M. Jönsson et al. (21) überein, die zeigen konnten, daß ihre isolierten Urininhibitoren keine meßbare Hemmung auf Pankreas-Elastase hatten.

C.2.3. Hemmung von Rindertrypsin

Für den Trypsin-Hemmtest (B.3.3.3.) kamen jeweils ca. 33 μg Rindertrypsin und steigende Mengen an ITI (0 μg , 30 μg , 60 μg , 90 μg , 120 μg und 150 μg) zum Einsatz.

Wie erwartet (10), erwies sich der vorliegende Inter- α -Trypsininhibitor für Rindertrypsin als starker Hemmstoff (Abb. 7). Die Hemmkonstante K_i des ITI für Trypsin vom Rind wird mit $2,1 \times 10^{-11}$ M angegeben (10). Die in der Arbeit von B.M. Jönsson et al. (21) beschriebenen Urininhibitoren sind ebenso wie der von K. Hochstrasser (32) dargestellte Urininhibitor gute Hemmstoffe für Rindertrypsin.

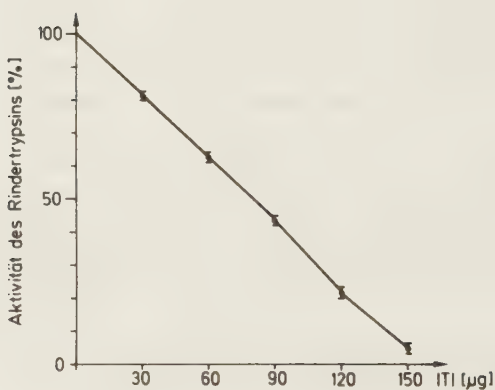


Abb. 7: Hemmung des Rindertrypsin durch steigende Mengen an ITI.

C.2.4. Hemmung von α -Chymotrypsin

Zum Nachweis der Hemmung von 1 μg Chymotrypsin (B.3.3.4.) wurden jeweils 0 μg , 2,5 μg , 5 μg , 7,5 μg , 10 μg und 15 μg ITI verwendet. Die entsprechende Hemmkurve ist in Abb. 8 dargestellt. In Übereinstimmung mit Literaturangaben (2) erwies sich das untersuchte ITI-Präparat auch als guter Hemmstoff für Chymotrypsin.

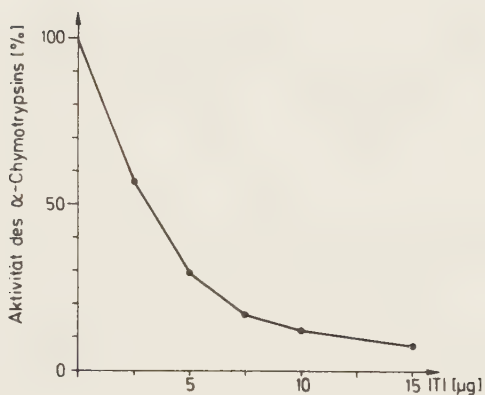


Abb. 8: Hemmung des α -Chymotrypsin durch steigende Mengen an ITI.

C.3. Charakterisierung der PMN-Elastase — ITI-Reaktion

Um aufzuklären, wie die Hemmung der granulozytären Elastase durch den ITI zustande kommt, wurden zunächst kinetische Messungen durchgeführt.

C.3.1. Kinetische Messungen

Es wurden vier verschiedene Ansätze (1 Enzymansatz, 3 Hemmansätze) für den Elastase-Test (nach B.3.3.1.) ausgewählt:

- a) ohne ITI
- b) mit ITI: 75 μg
- c) mit ITI: 150 μg
- d) mit ITI: 300 μg

Jeder der vier Ansätze wurde in Doppelproben mit jeweils fünf verschiedenen Substratkonzentrationen $[\text{mol/l}]$ durchgemessen:

- 1) $1,25 \times 10^{-4}$
- 2) $2,5 \times 10^{-4}$
- 3) 5×10^{-4}
- 4) 10×10^{-4}
- 5) 20×10^{-4}

Aus Ansatz a) wurde zunächst nach der Methode von Lineweaver-Burk (23) die Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Wert = Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit) des PMN-Elastase/SANA-Systems unter den gegebenen Bedingungen graphisch ermittelt (Abb. 9).

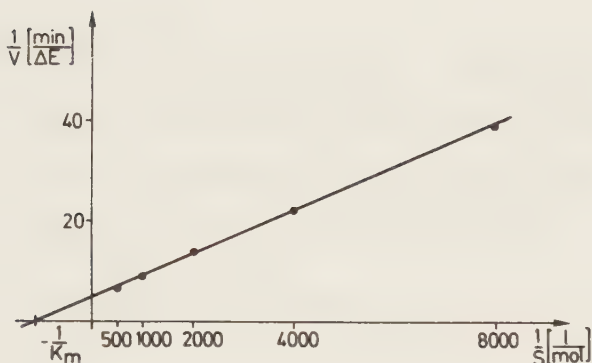


Abb. 9: Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_m -Wert) des PMN-Elastase/SANA-Systems nach Lineweaver-Burk.

Danach ergibt sich der gesuchte K_m -Wert als negativer Kehrwert des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse des Diagramms:

$$-\frac{1}{K_m} = -\frac{1}{500 \times 2,2} \text{ mol/l}$$

$$K_m = 0,92 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

C.3.1.1. Ermittlung von K_i

K_i ist definiert als Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Je größer der numerische Wert von K_i ist, desto geringer ist die Affinität des Inhibitors zum Enzym und desto instabiler ist der Komplex.

Zur Festlegung der Dissoziationskonstanten K_i wurden die einzelnen Meßergebnisse in ein Diagramm nach Dixon (5) eingezeichnet. Hierbei werden für variierende Inhibitormengen (a, b, c, d) die Meßwerte mit jeweils gleicher Substratkonzentration (1, 2, 3, 4 oder 5) durch eine Gerade verbunden. Die fünf Geraden schneiden sich in einem Punkt, dessen Abszissenwert die negative Dissoziationskonstante K_i darstellt (Abb. 10).

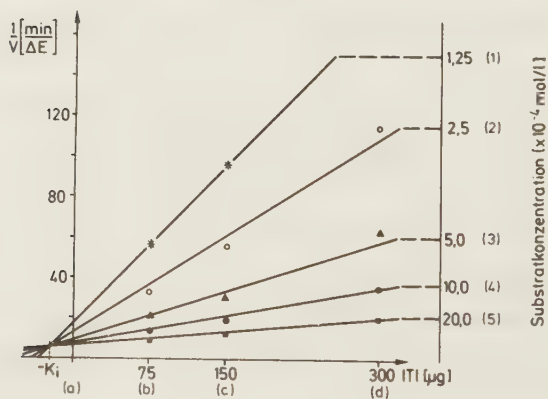


Abb. 10: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i nach Dixon.

Bei einer angenommenen Molekularmasse des ITI von ca. 170 kDa ergibt sich im vorliegenden Fall ein K_i von $4,7 \times 10^{-8}$ mol/l. Geht man jedoch davon aus, daß die PMN-Elastase den nativen ITI spaltet und dann mit einem ITI-Bruchstück, etwa dem physiologischerweise vorkommenden I-30, einen Komplex bildet, so erhöht sich der K_i -Wert bis auf $2,7 \times 10^{-7}$ mol/l.

C.3.1.2. Hemmart

Zunächst wurde die Substratumsatzgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für verschiedene Inhibitormengen dargestellt (Abb. 11).

Mit zunehmender Substratkonzentration S [mol/l] steigt jeweils die Umsatzgeschwindigkeit pro Zeiteinheit an, bis im Sättigungsbereich $v_{\max}$ erreicht ist.

In Gegenwart steigender Inhibitorkonzentrationen könnte dieser Maximalwert jedoch nur durch immer höhere Substratkonzentrationen erreicht werden, d.h. mit zunehmender Hemmstoffmenge erhöht sich bei unverändertem $v_{\max}$ der K_M -Wert ständig.

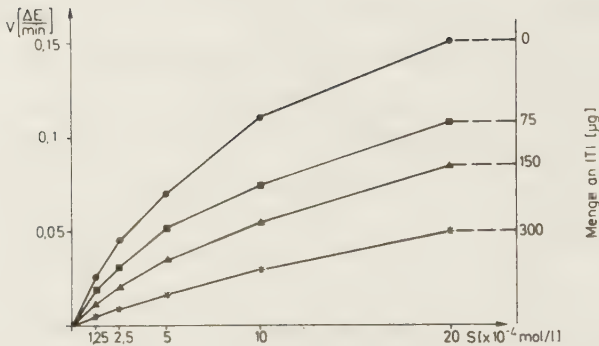


Abb. 11: Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit der PMN-Elastase von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener Mengen an ITI.

Trägt man nun für jede Inhibitormenge (a, b, c oder d) die Meßwerte bei variierenden Substratkonzentrationen (1, 2, 3, 4 oder 5) in ein Lineweaver-Burk-Diagramm ein und legt dann durch die entsprechenden Punkte einer jeden Testreihe (siehe C.3.1.) eine Kurve (Abb. 12), so schneiden sich die Geraden alle in einem Punkt auf der Ordinate, dessen Kehrwert der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit des Enzyms entspricht. Dies bedeutet, daß hier eine kompetitive Hemmung vorliegt: ITI oder ITI-Fragmente — was noch zu zeigen ist — und Substrat konkurrieren um die Bindung an das aktive Zentrum der granulozytären Elastase.

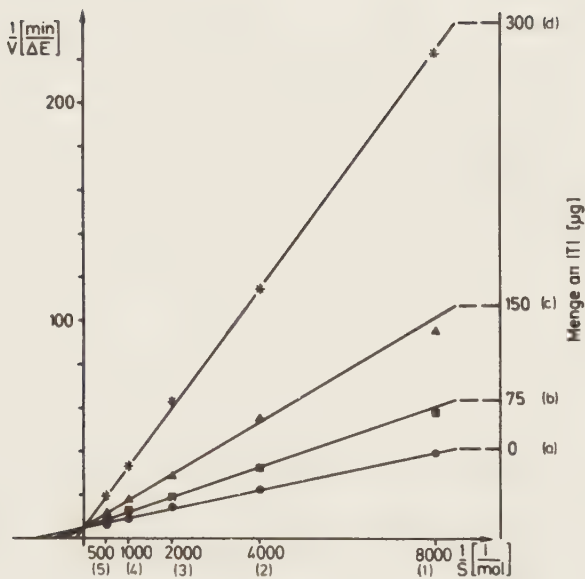


Abb. 12: Darstellung der Hemmart der ITI-Präparation gegenüber PMN-Elastase.

C.3.1.3. Einstellung des Hemmgleichgewichts

Um die Zeit bis zur Einstellung des Hemmgleichgewichts zu bestimmen, wurde ein Elastase-Test nach B.3.3.1. durchgeführt. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde jeweils die Aktivität der Elastase mit und ohne ITI gemessen.

Tabelle:

Ansatz		1	2
TRA-Puffer	μl	1970	1820
Elastase	μl	30	30
ITI	μl	—	150

Die Endkonzentrationen der Ansätze betrugen:

Elastase = $1,5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung

ITI = $7,5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung

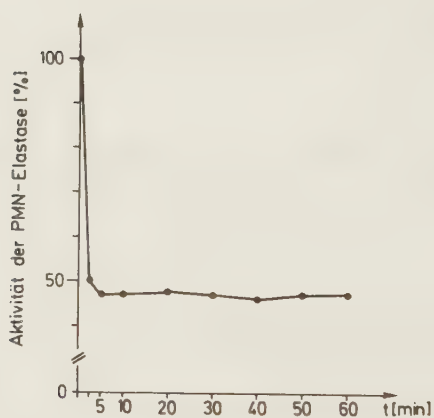


Abb. 13: Darstellung der Aktivität der PMN-Elastase in Gegenwart von $150 \mu\text{g}$ ITI als Funktion der Zeit.

Die Restaktivität der Elastase in Gegenwart von ITI wurde in % des ungehemmten Enzyms angegeben und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in ein Diagramm eingetragen (Abb. 13).

Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, daß eine Hemmung der Elastase praktisch sofort meßbar ist. Durch eine längere Vorinkubation (maximal 7 - 8 min) wird nur noch eine geringfügige Zunahme der Inhibition erreicht.

C.3.2. Elektrophoretische Methoden

Mit den nachfolgend beschriebenen Elektrophoreseverfahren sollte nun geklärt werden, ob der native Inter- α -Trypsininhibitor oder gewisse ITI-Fragmente einen Komplex mit der PMN-Elastase eingehen.

C.3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der relativen Molekularmassen der Produkte der Hemmreaktion Elastase — ITI diente eine 7,5 %ige SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (B.3.1.).

Der Probenansatz erfolgte nach untenstehendem Schema:

Ansatz	1	2	3
TRA-Puffer μl	30	—	150
Elastase μl	—	30	30
ITI μl	150	150	—

Die Endkonzentrationen betrugen für:

ITI = 300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung

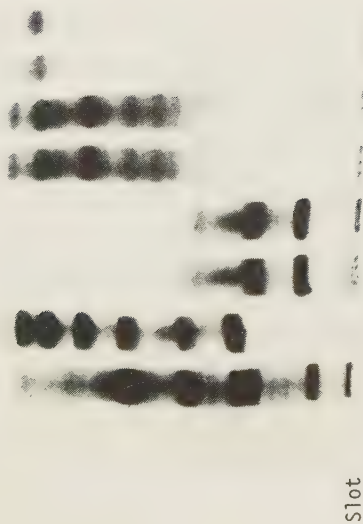
Elastase = 12 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung

Mit dem gleichen Verfahren wie in C.1.1. wurden dann die relativen Molekularmassen der einzelnen Banden festgestellt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 14, 15) läßt den Schluß zu, daß der native Inter- α -Trypsininhibitor keinen stabilen Komplex mit der PMN-Elastase bildet; ansonsten müßte in Slot Nr. 6 und 7 eine Bande mit einer Molekularmasse von über 170 kDa zu sehen sein. In der Annahme, daß der Komplex unter den angewandten Bedingungen dissoziiert ist, müßte zumindest eine Bande im Bereich von 170 kDa, dem nativen ITI entsprechend, auftreten.

Dagegen ist neben mehreren Bruchstücken bei Slot 6 und 7 eine besonders starke Bande mit einer Molekularmasse von ca. 30 kDa sichtbar; diese könnte dem von Hochstrasser definierten sog. physiologischen Inhibitor entsprechen, dessen relative Molekularmasse in neueren Arbeiten (z.B. 19 und besonderer Hinweis in 18) mit 30 kDa angegeben wird. Da der Komplex aus Elastase und ITI-Fragment nicht

+



Slot

Abb. 14: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

7,5 % Gel.

Aufgetragen wurde von links nach

rechts:

Slot 2 : Standard 1 (s. B.3.1.)

Slot 3 : Standard 2 (s. B.3.1.)

Slot 4+5 : jew. Ansatz 1 (nur ITI)

Slot 6+7 : jew. Ansatz 2 (ITI+Elastase)

Slot 8+9 : jew. Ansatz 3 (nur Elastase)



Abb. 15: Schematische Darstellung der Protein-

banden aus der SDS-PAGE (s. Abb. 14).

Die nebenstehenden Zahlen entsprechen

den relativen Molekularmassen angegeben

in kDa.

Farbintensität der Banden:



Standards ITI ITI + Elastase Elastase

sehr stabil ist - siehe C.3.1.1. - könnte er während der elektrophoretischen Wanderung zum Teil dissoziiert sein; die Bande mit der Molekularmasse von ca. 54 kDa hingegen könnte den Komplex aus Elastase und physiologischem Inhibitor darstellen. Darüber hinaus scheint aber auch der Anteil der ungehemmten Elastase für zusätzliche Bruchstücke des ITI verantwortlich zu sein, die z.B. als Banden bei 62 und 43 kDa zu sehen sind.

C.3.2.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Für die 1. Dimension betrug die Laufdauer ca. 2 Stunden bei einer Feldstärke von $E = 10 \text{ V/cm}$, für die 2. Dimension ca. 15 Stunden bei $E = 3 \text{ V/cm}$.

Die Ansätze erfolgten entsprechend dem nachstehenden Schema:

Ansatz	1	2	3
TRA-Puffer μl	30	—	150
Elastase μl	—	30	30
ITI μl	150	150	—
Aktivität der Elastase %	—	41	100

Die Endkonzentration des ITI betrug $83,3 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung, die der Elastase $16,7 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$.

Die Darstellung des ITI nach Ansatz 1 in Abb. 16 ist identisch mit der in Abb. 4. Eine Interpretation des Präzipitationsmusters erfolgte bereits in Abschnitt C.1.2.

Die reine Elastase (Ansatz 3) wandert unter den gegebenen Versuchsbedingungen als kationisches Protein ganz geringfügig in Richtung Kathode in das Trenngel der 1. Dimension ein (Abb. 17). In der 2. Dimension bewegt sich dann die Elastase bei geringerer Feldstärke nicht mehr.

In Abb. 18 (entsprechend Ansatz 2) sieht man neben einem deutlichen Hauptpräzipitat (Abstand von der Auftragsstelle ca. 1,1 bis 4,3 cm) mehrere schwächere. Das gesamte Präzipitationsmuster ist im Vergleich zum unbehandelten ITI (Abb. 16) deutlich kathodenwärts verschoben. Bei den Präzipitaten könnte es sich sowohl um Elastase-induzierte Abbauprodukte des ITI handeln als auch um Komplexe aus ITI bzw. ITI-Bruchstücken mit Elastase.

Im Gegensatz zu Ansatz 3 (Abb. 17) ist in Ansatz 2 (Abb. 19) die Elastase in der 1. Dimension nicht mehr in Richtung Kathode gelaufen. An der Grenzlinie der zwei Dimensionen findet sich vielmehr in Richtung Anode ein flacher Präzipitatstreifen. Sein gut sichtbarer Bereich hat von der Auftragsstelle eine Entfernung von ca. 0,7 bis 5,0 cm. Besonders stark ausgeprägt ist er im Abstand von 0,7 bis 3,6 cm. Dies läßt sich nur so deuten, daß die Elastase mit dem nativen ITI oder mit ITI-Fragmenten einen Komplex gebildet hat und daher ihre elektrophoretische Charakteristik entsprechend verändert ist.

+



+

+

-

O

Abb. 16: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 1 (nur ITI).

Im Gel der 2. Dimension waren 1,4 %

Anti-ITI-Serum enthalten.

+



-

Abb. 17: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 3 (nur Elastase)

Im Gel der 2. Dimension waren 0,6 %

Anti-Elastase-IgG-Fraktion enthalten.

+



O

+

-

+

Abb. 18: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 2 (III u. Elastase).

Im Gel der 2. Dimension waren 1,4 %

Anti-III-Serum enthalten.

+



O

-

Abb. 19: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 2 (III u. Elastase).

Im Gel der 2. Dimension waren 0,6 %

Anti-Elastase-IgG-Fraktion enthalten.

Die sehr ähnliche Lage der Hauptbanden in Abb. 18 und 19 deutet darauf hin, daß die Hauptbande in Abb. 18 doch durch eine Komplexbildung der Elastase mit ITI oder ITI-Fragmenten hervorgerufen wurde. Um den gesuchten Komplex noch eindeutiger darstellen zu können, wurden höher konzentrierte Lösungen von ITI und PMN-Elastase verwendet. Eine eventuelle Dissoziation der Komplexe sollte mittels der sog. "Intermediär-Technik" nach folgenden Ansätzen erfaßt werden:

Ansatz	1	2	3
TRA-Puffer μl	30	—	150
Elastase μl	—	30	30
ITI μl	150	150	—
Aktivität der Elastase %	—	48	100

Die Endkonzentrationen ergaben für:

Elastase = $40 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung

ITI = $235 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung

Die Dauer der Elektrophorese betrug in der 1. Dimension 2 Stunden bei einer Feldstärke von $E = 9 \text{ V/cm}$, in der 2. Dimension 15 Stunden bei $E = 3,5 \text{ V/cm}$.

Die in den Abb. 20, 21 und 23 dargestellten Untersuchungen brachten keine zusätzlichen Informationen zu den bereits besprochenen Elektrophoresemustern in Abb. 16, 17 und 19. Die Besprechung kann

sich daher auf Abb. 22 beschränken.

Wenn man davon ausgeht, daß die PMN-Elastase mit dem nativen ITI oder mit ITI-Bruchstücken Komplexe bildet, so müßte das Hauptpräzipitat unter den gegebenen Bedingungen bereits an der dem Gel der 1. Dimension benachbarten Grenzfläche des Intermediärgels beginnen. Da dies nicht der Fall ist, muß man annehmen, daß die Komplexe so instabil sind - relativ großer K_1 -Wert wie in C.3.1.1. bestimmt -, daß sie bei ihrem Lauf dissoziieren. Die Elastase bleibt an der Grenzlinie von der 1. Dimension zum Intermediärgel hängen ("Elastaselinie"), ITI-Fragmente (und/oder ITI) wandern weiter zu dem Gel, das das Anti-ITI-Serum enthält. Der gut sichtbare Teil des ITI-Hauptpräzipitats reicht von ca. 0,9 cm bis 4,5 cm von der Auftragsstelle, der der "Elastaselinie" von ca. 0,4 cm bis 4 cm.

+



Abb. 20: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Ansatz 1 wurde mit TRA-Puffer so verdünnt, daß die Konzentration des ITI ca. $47 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Ansatzlösung betrug.

In dem Gel der 2. Dimension waren 1,4 % Anti-ITI-Serum.

+



Abb. 21: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 3 (nur Elastase).

Im Gel der 2. Dimension waren 0,8 %

Anti-Elastase-IgG-Fraktion.

+



IMG

+

-

Abb. 22: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 2 (Elastase u. ITI).

Im Intermediärgel waren 0,6 % Anti-

Elastase-IgG-Fraktion, im anschließenden

Gel 1,4 % Anti-ITI-Serum.

(IMG = Intermediärgel)

Abb. 23: Zweidimensionale Immunelektrophorese.

Aufgetragen wurde Ansatz 2 (Elastase u. ITI).

Im Gel der 2. Dimension waren 0,8 %

Anti-Elastase-IgG-Fraktion enthalten.

+

-



+

D. DISKUSSION

Mit den kinetischen Messungen konnte eindeutig gezeigt werden, daß die PMN-Elastase durch den nativen ITI und/oder ITI-Bruchstücke gehemmt wird.

Probleme traten jedoch zutage bei der Deutung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und insbesondere bei der Beurteilung der zweidimensionalen Immunelektrophorese, die Klärung verschaffen sollten, ob der native ITI oder bestimmte ITI-Fragmente stabile Komplexe mit der granulozytären Elastase bilden.

Entgegen der ursprünglichen Erwartung konnte mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese keine Komplexbildung zwischen nativem ITI und PMN-Elastase festgestellt werden. Da bei den kinetischen Messungen eine Hemmung eindeutig nachweisbar war, d.h. eine Komplexbildung mit nativem ITI oder seinen Bruchstücken stattfand, ist zu folgern, daß diese Komplexe sehr instabil sind und während der Elektrophorese dissoziierten. Weiterhin ist bemerkenswert, daß nach der Komplexbildung eine entsprechende Bande für den nativen ITI nicht mehr auffindbar war (Abb. 14, 15, Slot 6 u. 7). Dies läßt den Schluß zu, daß die PMN-Elastase den nativen ITI in Bruchstücke aufgespalten hat und dann mit diesen Komplexe eingegangen ist. Diese Annahme stimmt mit den Ergebnissen von T. Dietl et al. (4) überein, die ebenfalls eine Spaltung des nativen ITI durch die granulozytäre Elastase feststellen konnten. Da bei dieser Spaltung

auch I-30 entsteht, ist die Komplexierung von PMN-Elastase mit I-30 sehr wahrscheinlich. Eine, wenn auch schwach ausgeprägte Bande mit $M_r = 54$ kDa konnte tatsächlich nachgewiesen werden. Die geringe Intensität dieser Bande ließe sich damit erklären, daß die gebildeten Komplexe unter den Versuchsbedingungen der Elektrophorese wieder zum Teil dissoziierten. Bekräftigt wird diese Aussage durch die relativ hohe Dissoziationskonstante des Komplexes (C.3.1.1.).

Während Wachter et al. (32) einen Urininhibitor mit $M_r = 30$ kDa fanden, der die PMN-Elastase nicht hemmte, konnten B.M. Jönsson et al. (21) einen Urinhemmstoff isolieren, der die PMN-Elastase sehr wohl inhibierte. Nach B.M. Jönsson sollen beide Hemmstoffe identisch sein. Diese Diskrepanz ließe sich am einfachsten durch die Annahme erklären, daß Wachter et al. unter Testbedingungen arbeiteten, bei denen der gebildete Komplex wieder vollständig zerfiel.

Auch in der zweidimensionalen Immunelektrophorese konnten die erwarteten Komplexe aus nativem ITI bzw. ITI-Bruchstücken und PMN-Elastase nicht nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der bereits zuvor gewonnenen Erkenntnisse läßt sich folgern: Die granulozytäre Elastase bildete Komplexe mit dem I-30. Die Elastase-I-30-Komplexe bewegten sich im elektrischen Feld zur Anode (vgl. Abb. 17 und 19, Abb. 21 und 23). Während der elektrophoretischen Wanderung dissoziierten sie kontinuierlich

infolge des relativ hohen K_1 -Wertes bei laufend zunehmender Verdünnung. Die jeweils zurückbleibende Elastase verursachte dann die oben beschriebene (C.3.2.2.) Präzipitatlinie.

Bestätigt wird die Annahme der Dissoziation durch die zweidimensionale intermediäre Immunelektrophorese (Abb. 22). Außer der bereits beschriebenen Elastase-Präzipitatlinie sind in dem mit ITI-Antiserum versetzten Gel der Elektrophoreseplatte mehrere ITI-Präzipitate zu sehen. Weiterhin kann man erkennen, daß die Elastase-Präzipitatlinie - ausführlich dargestellt in C.3.2.2. - etwas weniger anodenwärts gerichtet ist als der Hauptpeak im anti-ITI-Bereich.

Wie bereits dargelegt wurde, enthält der native ITI und damit auch der I-30 in der antitryptisch inaktiven Domäne einen Methioninrest. Diese Aminosäure könnte für die Elastasehemmung wesentlich verantwortlich sein. Um dies zu belegen, wurde der ITI mit den Oxidationsmitteln N-Chlorsuccinimid und Chloramin-T versetzt und anschließend ein Elastasetest durchgeführt. Wider Erwarten ging dabei jedoch die Hemmaktivität nur um ca. 10 % zurück. Zur Deutung kann im wesentlichen angeführt werden, daß der Methioninrest im ITI bereits zum Sulfoxid oxidiert war, so daß die chemische Oxidation keinen bedeutsamen Einfluß mehr auf die Hemmstärke hatte. In der Tat ist ein analoges System bekannt: Der native α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 PI) enthält ebenfalls einen Methioninrest im reaktiven Zentrum des Elastase-reaktiven

Bereichs; α_1 PI ist ein sehr potenter Inhibitor der PMN-Elastase. Durch Oxidation dieses Methioninrestes verliert der α_1 PI seine Hemmwirkung gegenüber der Pankreas-Elastase vollständig; gegenüber der PMN-Elastase macht sich die Oxidation nur in einer Verminderung der Hemmstärke (entsprechend einem um ca. 3 Zehnerpotenzen höheren K_i -Wert) bemerkbar (1). Die Verhältnisse liegen demnach beim oxidierten α_1 PI ganz analog wie beim eingesetzten ITI. Es ist deshalb anzunehmen, daß der Methioninrest im ITI bereits oxidiert ist, evtl. geschah dies bei der Isolierung oder in vivo. Der exakte Nachweis für diese Annahme kann jedoch nur mittels entsprechend empfindlicher chemischer Methoden durchgeführt werden.

Vergleicht man den in dieser Arbeit bestimmten K_i -Wert des I-30 für die PMN-Elastase, nämlich $K_i = 2,7 \times 10^{-7}$ mol/l, mit dem für Rindertrypsin, $K_i = 1,4 \times 10^{-11}$ mol/l (10), so ergibt sich, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen der I-30 ein schwacher Inhibitor für die PMN-Elastase ist. Der von uns verwendete Inter- α -Trypsininhibitor bzw. genauer gesagt sein Abbauprodukt I-30 spielen demnach als Hemmstoff für die PMN-Elastase in vivo nur eine geringe Rolle. Dies könnte sich jedoch für einen nicht oxidierten ITI gänzlich ändern, da dann - in Analogie zum α_1 PI - sehr wohl eine ausgeprägte Hemmung gegeben sein könnte.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, eine Hemmung bzw. Komplexbildung der granulozytären Elastase mit dem Inter- α -Trypsininhibitor nachzuweisen.

- 1) Der verwendete Inter- α -Trypsininhibitor bestand aus drei Fraktionen mit scheinbaren Molekularmassen von
 - a) 168.000 Da
 - b) 130.000 Da
 - c) 70.000 Da
- 2) Mittels kinetischer Essays konnte gezeigt werden, daß die PMN-Elastase durch den Inter- α -Trypsininhibitor gehemmt wird. Für das System PMN-Elastase/SANA wurde eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_m = 0,9 \times 10^{-3}$ mol/l anhand eines Lineweaver-Burk-Diagrammes ermittelt.
- 3) Die granulozytäre Elastase spaltet den Inter- α -Trypsininhibitor in mehrere kleinere Bruchstücke und bildet dann mit bestimmten, nicht genauer identifizierten Fragmenten einen Komplex. Der säurestabile I-30 könnte dabei der Partner der PMN-Elastase sein. Die Dissoziationskonstante dieses Komplexes wurde graphisch nach der Methode von Dixon ermittelt: Legt man die Molekularmasse des I-30 mit $M_r = 30$ kDa zugrunde, so ergibt sich ein Wert von $K_i = 2,7 \times 10^{-7}$ mol/l. Es handelt sich dabei um eine kompetitive Hemmung: Substrat und Inhibitor,

genauer ITI-Fragment, konkurrieren um das aktive Zentrum der PMN-Elastase.

- 4) Die Pankreaselastase wird durch ITI nicht gehemmt; es ist sogar eine geringfügige Aktivitätssteigerung erkennbar.
- 5) Der ITI ist ein potenter Hemmstoff für Rindertrypsin und α -Chymotrypsin.
- 6) Bei der Oxidation des von uns verwendeten Inter- α -Trypsin-inhibitors mit N-Chlorsuccinimid bzw. Chloramin-T betrug der Verlust der PMN-Elastase-Hemmaktivität nur 10 % bzw. 12 %. Dies läßt den Schluß zu, daß der für die Hemmung evtl. verantwortliche Methioninrest des ITI bereits oxidiert war. Die Resultate der Arbeit weisen also darauf hin, daß das von uns verwendete Inhibitorpräparat nicht die native Form des ITI darstellt. Weiterführende chemische Untersuchungen sind daher notwendig, diese Frage endgültig zu klären.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Beatty K., Bieth J., Travis J.: Kinetics of Association of Serine Proteinases with Native and Oxidized α_1 -Proteinase Inhibitor and α_1 -Antichymotrypsin, J. Biol.-Chem., 255, pp. 3931 - 3934 (1980).
- 2) J. Bieth, M. Aubry u. Travis: The Interaction of Human Cationic Trypsin and Chymotrypsin II with Human Serum Inhibitors, pp. 53 - 62 in: Proteinase Inhibitors, Proceedings of the Second International Research Conference - Bayer Symposium, Springer Verlag. Eds. H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene u. E. Truscheit (1974).
- 3) B.J. Bromke and F. Kueppers: The Major Urinary Protease Inhibitor: Simplified Purification and Characterization, Biochem. Med. 27, pp 56 - 67 (1982).
- 4) T. Dietl, W. Dobrinski and K. Hochstrasser: Human Inter- α -Trypsininhibitor, Limited Proteolysis by Trypsin, Plasmin, Kallikrein and Granulocytic Elastase and Inhibitory Properties of the Cleavage Products, Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, pp. 1313 - 1318 (1979).
- 5) M. Dixon: The Determination of Enzyme Inhibitor Constants, Biochem. I., 55, pp. 170 - 171 (1953).

- 6) H. Fritz, N. Heimbürger, M. Meier, M. Arnold, L.I.D. Zaneveld und G.F.B. Schumacher: Humanakrosin: Zur Kinetik der Hemmung durch Human-Seruminhibitoren, Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, pp. 1953 - 1956 (1972).
- 7) H. Haupt, N. Heimbürger, T. Krantz und H.G. Schwick: Ein Beitrag zur Isolierung und Charakterisierung des C1-Inaktivators aus Humanplasma, Eur. J. Biochem. 17, pp. 254 - 261 (1970).
- 8) N. Heimbürger, H. Haupt and H.G. Schwick: Proteinase Inhibitors of Human Plasma, in: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Eds. H. Fritz and H. Tschesche (De Gruyter, Berlin, New-York) p. 1 (1971).
- 9) K. Hochstrasser, G.I. Albrecht, Ø.L. Schönberger, B. Rasche and K. Lempart: An Elastase-Specific Inhibitor from Human Bronchial Mucos, Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, pp. 1369 - 1375 (1981).
- 10) K. Hochstrasser, G. Bretzel, H. Feuth, W. Hilla and K. Lempart: The Inter- α -Trypsininhibitor as Precursor of the Acid-Stable Proteinase Inhibitors in Human Serum and Urine, Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, pp. 153 - 162 (1976).
- 11) K. Hochstrasser, H. Feuth, I. Fall, B. Kemkes: Säurestabile

Proteinaseinhibitoren im Blutplasma bei verschiedenen Nephropathien, Klin. Wschr. 52, p. 1015 (1974).

- 12) K. Hochstrasser, H. Feuth, B. Kemkes, I. Fall, E. Werle: Das Verhalten der säurestabilen Proteinaseinhibitoren in Serum und Harn nach Nierentransplantationen, Klin. Wschr. 52, p. 1018 (1974).
- 13) K. Hochstrasser, H. Feuth u. O. Steiner: Zur Charakterisierung der säurestabilen Proteinaseinhibitoren aus Humanplasma, Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, pp. 927 - 932 (1973).
- 14) K. Hochstrasser, J. Niebel, H. Feuth und K. Lempart: Über Abbauprodukte des ITI in Serum; I. Der ITI als Precursor des säurestabilen Serum-Trypsin-Plasmin-Inhibitors, Klin. Wschr. 55, pp. 337 - 342 (1977).
- 15) K. Hochstrasser, J. Niebel und K. Lempart: Über Abbauprodukte des Inter- α -Trypsininhibitors im Serum; II. Säurestabile Derivate des Inter- α -Trypsininhibitors, Klin. Wschr. 55, pp. 343 - 345 (1977).
- 16) K. Hochstrasser, B. Rasche, C. Mietens, K. Schorn, C.E. von Pilar und A. Bum: Der humorale Inter- α -Trypsininhibitor als Inhibitogen für sekretorische Proteinaseinhibitoren; Serumkonzentrationen bei Erwachsenen und Kindern mit Atemwegserkrankungen, Pneumologie Suppl., pp. 137 - 143 (1976).

- 17) K. Hochstrasser, Ü.L. Schönberger, I. Rossmanith and E. Wachter:
Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis
of the Inter- α -Trypsininhibitor, V. Hoppe - Seyler's Z. Physiol.
Chem. 362, pp. 1357 - 1362 (1981).
- 18) K. Hochstrasser, Ü.L. Schönberger, K. Lempart and M. Metzger:
Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis
of the Inter- α -Trypsininhibitor, VI. Hoppe - Seyler's Z. Physiol.
Chem. 362, pp. 1363 - 1367 (1981).
- 19) K. Hochstrasser and E. Wachter: Kunitz-Type Proteinase Inhibi-
tors Derived by Limited Proteolysis of the Inter- α -Trypsinin-
hibitor, I. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, pp. 1285 -
1296 (1979).
- 20) D. Johnson and J. Travis: The Oxidative Inactivation of Human
 α_1 -Proteinase Inhibitor, The Journal of Biological Chemistry
Vol 254, Nr. 10, pp. 4022 - 4026 (1979).
- 21) B.M. Jönsson, C. Löffler and K. Ohlsson: Human Granulocyte
Elastase is Inhibited by the Urinary Trypsin Inhibitor,
Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, pp. 1167 - 1175 (1982).
- 22) P. Lambin, J.M. Fine and M. Steinbuch: Nouvelles données sur une
antiprotéinase du plasma humain: l'inter-alpha-trypsine inhibiteur.

Rev. Fr. Tranf. Immun. Hematol. 18, pp. 385 - 400 (1975).

- 23) H. Lineweaver and D. Burk: The Determination of Enzyme Dissociation Constants, Journal of the Amer. Chem. Soc. 56, pp. 658 - 666 (1934).
- 24) B. Rasche, K. Hochstrasser und C. Mietens: Über die Bedeutung des ITI (Serumkonzentrationen bei Kindern, Altersstufe verschieden), Klin. Wschr. 55, pp. 795 - 800 (1977).
- 25) J.P. Salier, J.P. Martin, P. Lambin, H. McPhee and K. Hochstrasser: Purification of the Human Serum Inter- α -Trypsin-inhibitor by Zinc Chelate and Hydrophobic Interaction Chromatographies, Anal. Biochem. 109, pp. 273 - 283 (1980).
- 26) J.P. Salier, D. Vercaigne, R. Sesboüe and J.P. Martin: Inter- α -Trypsininhibitor (ITI): Use of Immunoabsorbents for Preparation of Anti-ITI Antiserum, ITI-free Human Serum and Purified ITI, J. of Immun. Meth. 47, pp. 239 - 248 (1981).
- 27) I. Schechter and A. Berger: On the Size of the Active Site in Proteases, I. Papain, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, pp. 157 - 162 (1967).
- 28) I. Schechter, Y. Burnstein and Patchornik A.: Selective Oxidation of Methionine Residues in Proteins, Biochemistry 14, pp. 4497 - 4503 (1975).

- 29) M. Steinbuch: The Inter- α -Trypsininhibitor, in: Methods of Enzymology (Lorand, L ed.), Vol. 45, pp. 760 - 772, Academic Press, New York, San Francisco/London (1976).
- 30) E. Wachter, K. Hochstrasser, G. Bretzel and S. Heindl: Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter- α -Trypsininhibitor, II. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, pp. 1297 - 1303 (1979).
- 31) E. Wachter and K. Hochstrasser: Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter- α -Trypsininhibitor, III. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, pp. 1305 - 1311 (1979).
- 32) E. Wachter and K. Hochstrasser: Kunitz-Type Proteinase Inhibitors Derived by Limited Proteolysis of the Inter- α -Trypsininhibitor, IV. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, pp. 1351 - 1355 (1981).
- 33) I. Witte, M. Jochum, R. Scherer, W. Schramm, K. Hochstrasser and H. Fritz: Disturbances of Selected Plasma Proteins in Hyperdynamic Septic Shock, Intensive Care Medicine, 8, pp. 215 - 222 (1982).

L E B E N S L A U F

- 21.11.1958 geboren in Salzberg/Berchtesgaden als erstes Kind von Franz Angerer und Paula Angerer, geb. Größwang
- 1965 - 1969 Besuch der Grundschule in Bischofswiesen
- 1969 - 1978 Besuch des Gymnasiums an der Salzburgerstraße in Berchtesgaden
- 29.06.1978 Reifeprüfung
- 01.07.1978 -
30.09.1979 Ableistung des Wehrdienstes
- 01.11.1979 Beginn des Studiums der Medizin
- 25.08.1981 Ärztliche Vorprüfung
- 26.08.1982 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 24.08.1984 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 11.11.1985 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 21.11.1985 Approbation als Arzt

